

Radioimmunoassay による強心配糖体微量 定量法の感度と特異性について*

小沼 静子 藤野 澄子

札幌医科大学薬理学教室 (主任 田中教授)

Affinity and Specificity of Radioimmunoassay for Cardiac Glycosides.

Shizuko ONUMA and Sumiko FUJINO

Department of Pharmacology, Sapporo Medical College

(Chief: Prof. M. Tanaka)

Digitoxin-, digoxin- and ouabain-antisera with a high affinity and specificity for respective glycosides were obtained by using a new procedure developed by us from Smith's method. Radioimmunoassay (RIA), techniques were applied and the characteristics of the antisera were studied. The following results were obtained.

- 1) These antisera are capable of detecting 0.1 ng/ml of digitoxin, digoxin and ouabain.
- 2) Each antiserum reacts with the respective corresponding glycosides with a high degree of specificity and shows no significant crossreactivity with the other two non-corresponding glycosides.
- 3) With respect to the reactivity of some derivatives of corresponding glycosides, the reactions of digitoxin-antiserum with digitoxin-metabolites such as digitoxigenin bis-digitoxosid and digitoxigenin mono-digitoxosid and that of digoxin antiserum with digoxigenin bis-digitoxosid and digoxigenin mono-digitoxosid are almost unrecognizable; however, ouabain-antiserum reacts with hydro-ouabain to a similar degree as in the case of ouabain.

On the basis of these results, the relationship between RIA-specificity, sensitivity of these antisera of cardiac glycosides and the chemical structure of the glycosides was discussed.

緒 論

強心配糖体は古くから有効な強心薬として広く用いられているが、反面、中毒をおこしやすい危険な薬物でもあるため、使用に際しては慎重を要するものとされている。この中毒を予防する一つの手段として、血行中の強心配糖体の濃度を正確に知ること大切と考えられる。この目的のために各種の強心配糖体微量定量法¹⁾が研究されてきた。近年、ステロイドホルモンの微量定量法として Radioimmunoassay (以下 RIA) が開発され、臨床応用も普及しつつある現状である。この RIA の原理を強心配糖体、ことに digitoxin, digoxin の定量に応用した Smith^{2,3,4,5)}らおよび Oliver⁶⁾らはすぐれた成績を報告している。一方、RIA 以外の微量定量として、強心配糖体が Na-K-ATPase に特異的に結合し、その活性を抑制することを利用した定量法として赤血球の ⁸⁶Rb 摂取法^{7,8,9)}、および ATPase^{10,11,12)} との結合法がある。これらは RIA 法

とは異なり、生物学的定量法であって生物活性に依存した方法である。

実際にジギタリス中毒患者の血中 digoxin 濃度を上記の 2 法にて測定し比較した成績によると、両者の測定値がほとんど一致したとの報告¹³⁾もあるが、また一致しないとの報告¹⁴⁾もある。このことは、血中には強心配糖体の代謝産物が多種出現すると推定されるが、そのうちには、生物学的活性の強いものから、活性のないものまで存在するものと考えられるので、2 法による測定値に相違があっても不思議ではない。

RIA 法は抗原-抗体反応に依存するもので生物学的活性とは無関係であるので、特異性がより大であるものと考えられる。そこでまず、digitoxin, digoxin およびまだ未検討である ouabain を材料として、抗血清を作製し、これらの特異性、感度について検討した。ことに、それぞれの代謝産物との相関に注目した。その結果を報告する。

* 本論文の要旨は第 23 回日本薬理学会北部会 (昭和 47 年 10 月於富山市) にて発表した。

実験方法

1. 抗体の作製

① 抗原(強心配糖体-蛋白-抱合体)の調製

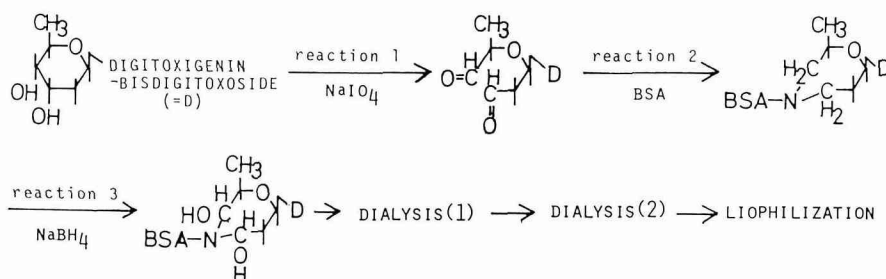
Smith and Butler⁴⁾らの方法に準じて, digitoxin, digoxin および ouabain とアルブミンとの抱合体を作製した. Fig. 1 は digitoxin-アルブミン抱合体の合成法であるが, この合成法を digoxin および ouabain との蛋白抱合体合成の場合にも用いた. すなわち, digitoxin 約 500 mg (0.5 mmole) を無水 ethanol 20 ml に溶解し, これに 0.1 M 過ヨード酸ナトリウム 20 ml を攪拌しながら滴加する(反応1). 25 分後, 1 M ethyleneglycol 0.6 ml で過剰の過ヨード酸ナトリウムを分解する. 次にこの反応液に牛血清アルブミン(以下 BSA とする)溶液(牛血清アルブミン 560 mg を 20 ml の水に溶解し, 5% 炭酸カリウム 0.4 ml で pH 9.5 に調製した)を攪拌しながら滴加する. この間, 反応液の pH は 5% 炭酸カリウム液 2.0 ml の滴加により 9.0~9.5 に保った(反応2). 45 分後, 新たに調製した水素化ホウ素ナトリウム液 (0.3 g/20 ml H₂O) を加える(反応3). 3 時間後, 1 M ギ酸 7.6 ml を加えて pH を 6.5 として 1 時間攪拌した後, 1 M-水酸化アンモニウム 1.5 ml を加えることにより pH 8.5 とする. その後, 全反応液をセ

ルロースチューブ (18/32 三光純薬社製) で流水中 24 時間透析する(透析1). 次に透析内容液をビーカーに移し 0.1 N-塩酸 2.8 ml を加えて pH を 6.85~4.5 とする. 1 時間室温に静置し, 次いで 4°C で 4 時間静置すると大部分の蛋白が沈殿する. この懸濁液を 4°C で 1,000×g 1 時間遠心し, 沈渣を 0.15 M 炭酸水素ナトリウム液 5 ml に溶かし, 再び流水で 4 日間透析する(透析2). 最後に, 透析内容液を凍結乾燥して -20°C で貯える. 最終生成物の収量は digitoxin-BSA 361 mg, digoxin-BSA 237 mg, ouabain-BSA 339 mg であった. また, これらの吸収スペクトルを島津ダブルビーム UV-200 型分光光度計により, 83% 硫酸中で測定し, BSA およびフリーの digitoxin, digoxin または ouabain と比較した. digitoxin-BSA は 475 nm に最大吸収を有し, これに相当する digitoxin の最大吸収は 483 nm であった. 同様に digoxin-BSA は 474 nm で digoxin は 482 nm, さらに ouabain-BSA は 287 nm で ouabain は 326 nm であった.

Fig. 2 に digitoxin, digoxin および ouabain のアルブミン抱合体の構造式を示した.

② 免疫方法

上記の抗原(強心配糖体-アルブミン抱合体)の 1 mg を 1 ml の生理食塩水に溶解し, 等量の Freund's complete



digitoxin 26 mCi/mg, digoxin 1 mCi/mg, ouabain 20 mCi/mg, England Nuclear 社製) およびリン酸緩衝液を加えて全量を 0.8 ml とし、よく混和後 15 分間室温に放置する。この間に抗体との結合において非標識配糖体と標識配糖体との間に競合が行なわれるのである。

次いで dextran-coated-charcoal 懸濁液 (5% charcoal 懸濁液と 0.5% dextran 溶液との等量混合液) を添加し、抗血清と結合していない配糖体を吸着させる。この吸着物を 15 分の遠沈により除き、上清を counting vial にとり Bray's Scintillator 15 ml を加え Liquid Scintillation Counter (堀場製 LS-500 型) にてその radioactivity を測定する。これを基としてその抗血清と結合した ^3H -強心

配糖体量を算出し、結合百分率を求める。

実験結果

① Assay の感度

digitoxin, digoxin および ouabain のそれぞれに対する抗血清をつくり、これを用いて radioimmunoassay を行ないその感度を調べた。Fig. 3 a) は digitoxin の標準液 (0.1~10 ng/ml) の存在による抗血清に対する ^3H -digitoxin の結合率の変動を示したものである。この方法による digitoxin の検出は 0.1 ng/ml まで digitoxin 抗血清で検出可能であった。また抗血清の活性が一定であって添加する ^3H -digitoxin の量も一定の時には、結合率の大小

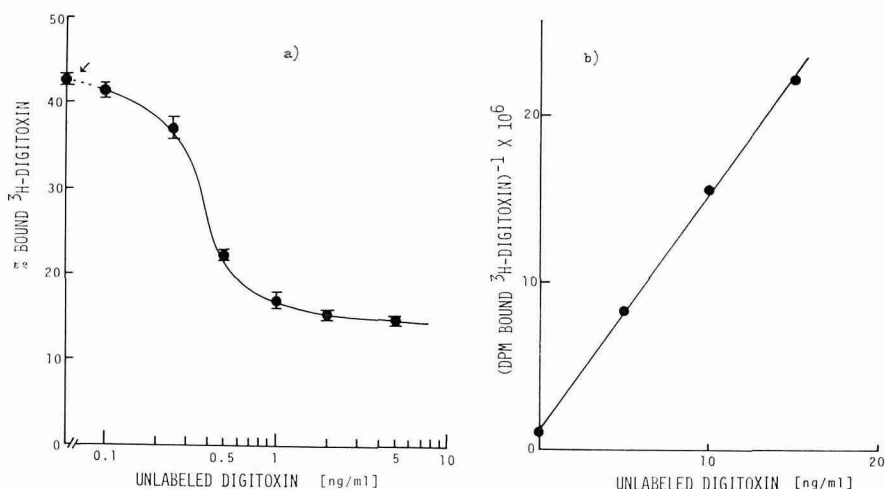


Fig. 3 a) Standard curve for digitoxin radioimmunoassay.
b) Reciprocal plot of standard radioimmunoassay data shown Figure 3 a) have been plotted as reciprocal antibody bound ^3H -digitoxin counts against a linear scale of unlabelled digitoxin concentration.

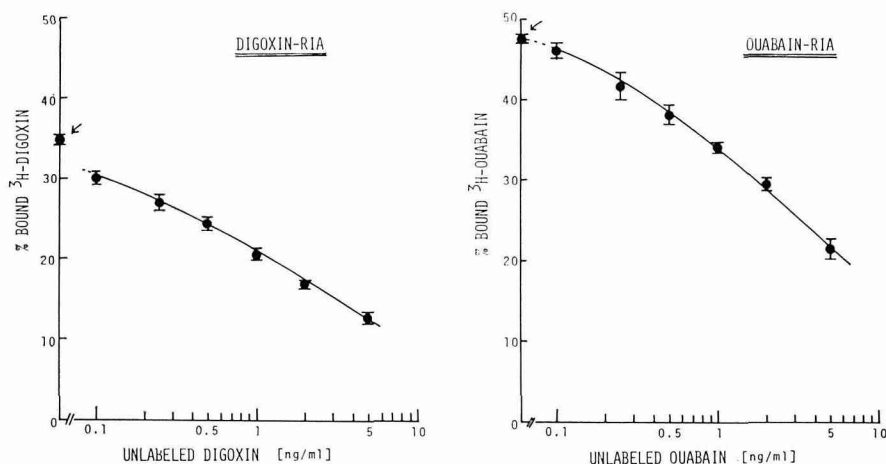


Fig. 4 Standard curve for digoxin and ouabain radioimmunoassay.

を結合した ^3H -digitoxin 量で示すことも可能である. そこで Fig. 3 b に示すように, たて軸に抗体結合 digitoxin の量 (dpm) の逆数をプロットし, 横軸に非標識 digitoxin 標準液の濃度をとってみると, 検量線は直線となった. 同様に digoxin, ouabain 抗血清の場合の結果は Fig. 4 に示すごとくになった. これらの結果より digoxin および

ouabain の何れについても 0.1 ng までの定量が可能であった.

② Assay の特異性

まず digitoxin 抗血清の特異性については, digitoxin 以外の数種の強心配糖体との結合状態から判定した. この場合の非標識配糖体として, digitoxin, digitoxigenin,

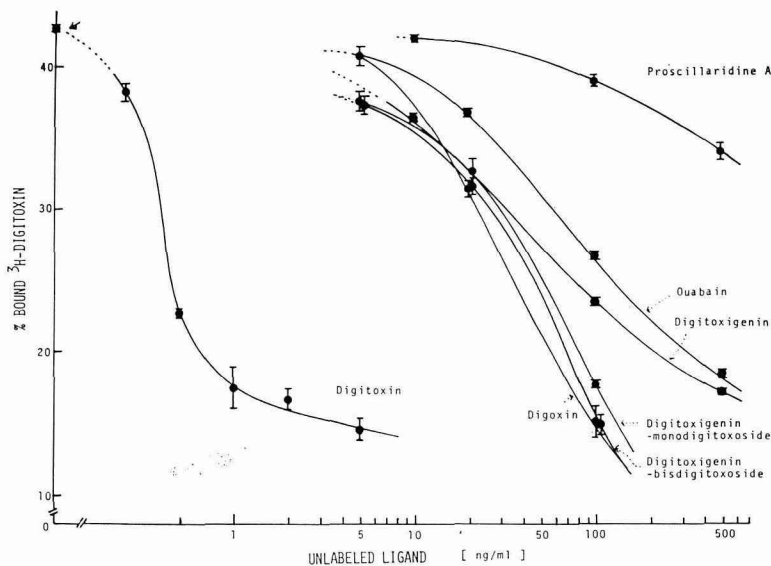


Fig. 5 Specificity of anti-digitoxin serum.

The figure shows that digitoxigenin, digitoxigenin monodigitoxoside, digitoxigenin bisdigitoxoside, digoxin, ouabain and proscillaridine A are much less potent than digitoxin in displacing ^3H -digitoxin from antibodies. The arrow on vertical axis denotes binding in the absence potentially competing ligand.

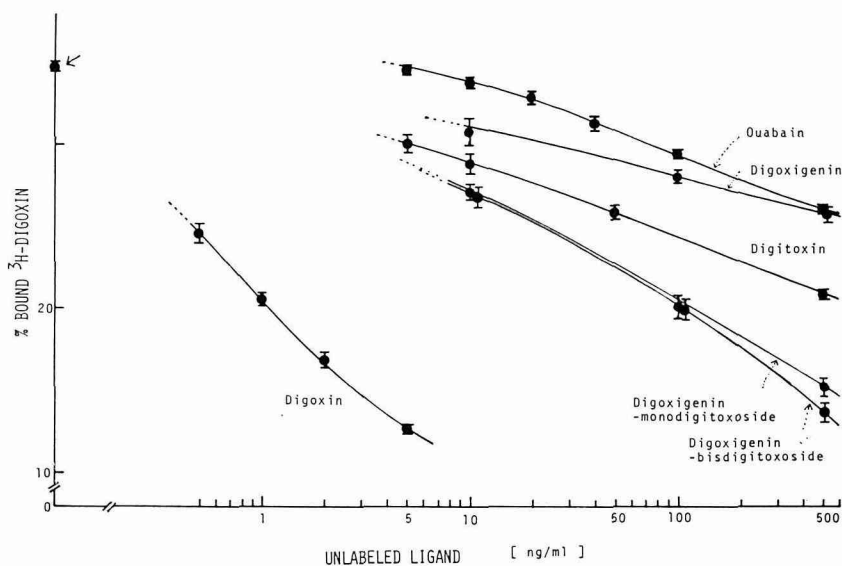


Fig. 6 Specificity of anti-dioxin serum.

digitoxigenin-monodigitoxoside, digitoxigenin-bisdigitoxoside, digoxin, ouabain 等を用いた. digitoxin と digoxin とは C-12 位に OH 基を有するか否かの 1 点だけ異なるのみで, 非常に構造が似ているにもかかわらず, Fig. 5 から明らかなように, digitoxin 抗血清は顕著に digitoxin と digoxin を識別した. 一方, ステロイド核部分の構造は同じで糖部分の構造が異なる digitoxigenin (糖が 3 個欠除), digitoxigenin-monodigitoxoside (糖が 2 個欠除) および digitoxigenin-bisdigitoxoside (糖が 1 個欠除) の場合も明らかに digitoxin と離れた曲線を得た.

また構造的にはステロイド核部分も糖部分も異なる ouabain に至っては, digitoxin とは更に著明に離れた曲線となった. digoxin 抗血清, ouabain 抗血清の特異性についても同様の結果であった (Fig. 6, Fig. 7). Table 1 は, 抗血清に結合する ^3H -強心配糖体の量が, 非標識強心配糖体の存在によって非存在時の 50% に減少させるのに必要なその強心配糖体の量 (濃度) を表示したものである. たとえば, digitoxin 抗血清の場合, 抗血清と ^3H -digitoxin との結合量を始めの 50% に減少させるに必要な非標識 digitoxin の濃度は 0.62 ng/ml であり, digitoxigenin で

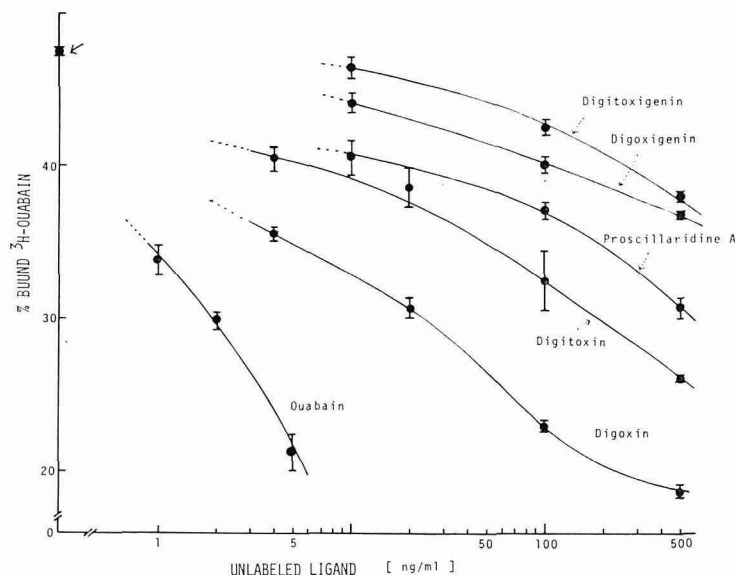


Fig. 7 Specificity of anti-ouabain serum.

Table 1 Comparison of specificity among digitoxin-, digoxin- and ouabain-specific antisera

The table shows the concentration and ratio of various ligand to decrease 50% of value of bound ^3H -ligand of the value in absence nonlabelled ligand

Ligand		Digitoxin				Digoxin				Ouabain		prosci. ⁵⁾
		Digitoxin	genine	mono ¹⁾	bis ²⁾	Digoxin	genine	mono ³⁾	bis ⁴⁾	Ouabain	Dihydro-ouabain	
DIGITOXIN	ng/ml	0.62	106	56	56	66				270		1000<
	ratio	①	170	90	90	104				429		1600<
DIGOXIN	ng/ml	800				1.25	1000<	260	260	1000<		1000<
	ratio	640				①	800<	200	200	800<		800<
OUABAIN	ng/ml	1000<	1000<			88	1000<			4.9	15.2	1000<
	ratio	204<	204<			18	204<			①	3.1	204<

1) mono = Digitoxigenin - monodigitoxoside

2) bis = Digitoxigenin - bisdigitoxoside

3) mono = Digoxigenin - monodigitoxoside

4) bis = Digoxigenin - bisdigitoxoside

5) prosci. = Proscillaridine A

は 106 ng/ml であった。前者の値を ① としたときの他の各強心配糖体の必要濃度を算出すると, digitoxigenin-mono および -bisdigitoxoside は 90 倍, digitoxigenin は 170 倍, digoxin は 104 倍, ouabain は 429 倍の濃度となった。つまり倍率が高いものほど抗血清との親和性が低いということであって, digitoxin と識別しやすいことを示すものである。

同様に, digoxin 抗血清と非標識 digoxin の結合を ① とすると, digitoxin は 640 倍, ouabain は 800 倍以上の濃度を必要とした。

また ouabain 抗血清と非標識 ouabain を ① とすると, ラクトン環が還元された dihydroouabain は 3.1 倍, proscillaridine A は 204 倍, digoxin は 18 倍の濃度であった。

考 按

1. 抗原の作製について

強心配糖体—蛋白抱合体を作製するに際して, 蛋白としてヒト血清アルブミンまたは牛血清アルブミンが用いられ、合成法も色々試みられているが, 著者らは Butler⁴⁾らの方法により牛血清アルブミン (BSA と略) との抱合体を作製した。500 mg の digitoxin, digoxin および ouabain を原材料として, それぞれ 361, 237 および 357 mg の BSA 抱合体を得た。これらの収量はかなり良好と考えられるが, 原強心配糖体の蛋白結合能の程度とは無関係であり, これらの抗原性も 3 者だいたい同程度であった。

なお, proscillaridine A について同様の方法にて BSA 抱合体を作製したが, 得られた抗血清の活性がはなはだ弱く, RIA 用には不適であった。これについては方法論的に再検討を要すると考えられる。

2. 感受性および特異性について

① 免疫期間との関係

著者らの今回作製した digitoxin 抗血清, digoxin 抗血清および ouabain 抗血清を用いてのそれぞれの強心配糖体の測定限界はいずれも 0.1 ng/ml serum であった。これは Oliver⁶⁾らのそれよりも鋭敏であり, Smith and Butler²⁾らの原法とは同等である。免疫期間として Smith らは 12~97 週行い, 得た血清の抗体価は免疫日数とともに上昇するが, 特異性については反対に低下したと報告している。著者らは 4 週間という短い期間の免疫であったが, 感度についても, また特異性についても満足すべき成果を得たと考えられる。

② 代謝産物との関係

Table 1 から明らかなように, digitoxin 抗血清, digoxin 抗血清および ouabain 抗血清のいずれもすぐれた特異性を示した。たとえば, digitoxin 抗血清は digitoxin と強

く結合するが, これ以外の強心配糖体およびそれらの代謝産物との結合は 100 倍以上も弱いために, digitoxin を特異的に識別できた。このことは反面, digitoxin 抗血清は digitoxin 以外のものの測定には不都合であることを示すものである。digoxin 抗血清についても全く同様である。ただし, ouabain 抗血清については, ouabain と dihydroouabain との識別は困難のようである。

これらの事実から考えると, ヒトのジギタリス中毒の予知のために血中ジギタリス濃度測定にあたって, digitoxin 抗血清または digoxin 抗血清のみを用いたのでは, それらの代謝物の存在を見逃すことになる。現時点ではヒトにおける配糖体の代謝物の詳細は明らかではないが, これら代謝物が明らかになった時点では, これらの抗血清をも使用する必要が生じるかもしれない。将来の研究に待ちたい。

また最近, 教室の吉田¹⁵⁾はネコについて digitoxin の体内代謝物について検討を加えたが, digitoxin の水溶性代謝物 (glucuron 酸または硫酸抱合体) が比較的大量に血中に見出されるという。このもののジギタリス中毒における役割は未詳であるが, digitoxin の腸肝循環を介しての体内蓄積現象に関与するものと推定されている。従ってこの水溶性代謝物の測定も有意義である。この測定に RIA が利用できるか否かは現在不明である。今後の検討に待つところである。

③ 化学構造との関係

強心配糖体の化学構造上の重要な部位は, 1) ステロイド母核, 2) 糖, 3) ラクトン環の 3 つと考えられる。抗血清の特異性に対するこれら構造部位の役割を考察してみると

1) ステロイド核……C-12 位に OH 基を有することだけの構造上の相違である digoxin と digitoxin はお互いにはっきりと識別し, 交差反応は認められない。digoxin 抗血清はより強く digitoxin を拒否するようである。

2) 糖の種類と数……C-3 位の糖についてみると, digitoxose の数が 3 つである原配糖体と, 糖の脱落した代謝産物とは明らかに識別される。ただし, digitoxose の 1 つのもの, 2 つのものの識別は困難のようである。このように digitoxose の数が抗血清の特異性に影響しているようである。また糖の種類について当然考えられるところであるが, 今回は検討できなかった。

3) ラクトン環……今回用いた配糖体のうちでは ouabain と dihydroouabain とはラクトン環の二重結合の有無の相違であるが, ouabain 抗血清は dihydroouabain を識別しえないようである。もちろん 6 員環である proscillaridine A に対しては明らかにこれを識別しうるのである。

結 論

Smith の原法を改良してえた各種強心配糖体抗血清を用い、Radioimmunoassay の感度ならびに特異性を詳細に検討した。

1) 作製した digitoxin, digoxin および ouabain 抗血清を用いての Radioimmunoassay の測定限界はいずれも 0.1 ng/ml serum であった。

2) digitoxin 抗血清は digitoxin と強く反応したが、他の強心配糖体やその代謝物との反応は極めて弱かった。

3) digoxin 抗血清は digoxin と強く反応したが、digoxin 以外の配糖体とは反応し難かった。

4) ouabain 抗血清は dihydroouabain とともに ouabain と同程度の結合性を示した。

5) 抗血清の感度並びに特異性と免疫期間、化学構造、代謝物との関係について論じた。

本稿を終るのにぞみ、ご懇篤なるご指導、ご校閲をたまわった田中護教授に深甚なる謝意を捧げると共に、ご協力をいただいた教職員各位に感謝します。

(昭和 51. 3. 3 受付)

文 献

- 1) 藤野澄子：生体内ジギタリスの微量定量法。呼吸と循環 **20**: 1037-1047 (1972).
- 2) Smith, T. W. and Butler, V. P.: Determination of therapeutic and toxic serum digoxin concentrations by radioimmunoassay. *New Eng. J. Med.* **281**: 1212-1216 (1969).
- 3) Smith, T. W.: Radioimmunoassay for serum digitoxin concentration. Methodology and clinical experience. *J. Pharmacol. Exper. Ther.* **175**: 352-360 (1970).
- 4) Smith, T. W., Butler, V. P. and Haber, E.: Characterization of antibodies of high affinity and specificity for the digitalis glycoside digoxin. *Biochemistry* **9**: 331-337 (1970).
- 5) Smith, T. W.: Ouabain-specific antibodies: Immunochemical properties and reversal of Na-K-activated adenosine triphosphatase inhibition. *J. Clin. Invest.* **51**: 1583-1593 (1972).
- 6) Oliver, G. C.: The measurement of digitoxin in human serum by radioimmunoassay. *J. Clin. Invest.* **47**: 1035-1042 (1968).
- 7) Lowenstein, J. M. and Corrill, E. M.: An improved method for measuring plasma and tissue concentrations of digitalis glycosides. *J. Lab. Clin. Med.* **67**: 1048-1052 (1966).
- 8) Ritzman, L. W., Bangs, C. C. and Coinner, D.: Serum glycoside levels in digitalis toxicity. *Circulation* **40** (Supp. III): 170 (1969).
- 9) Burnet, G. H. and Conklin, R. L.: The enzymatic assay of plasma digitoxin levels. *J. Lab. Clin. Med.* **71**: 1040-1044 (1968).
- 10) Bertler, A. and Redfors, A.: An improved method of estimating digoxin in human plasma. *Clin. Pharmacol. Ther.* **11**: 665-673 (1970).
- 11) Brooker, G. and Jelliffe, R. W.: Determination of serum digoxin by enzymatic isotopic displacement of ^3H -digoxin from Na-K-ATPase. *Fed. Proc.* **28**: 608 (1969).
- 12) Brooker, G. and Jelliffe, R. W.: Serum cardiac glycoside assay based upon displacement of ^3H -ouabain from Na-K-ATPase. *Circulation* **45**: 20-36 (1972).
- 13) Lader, S., Bye, A. and Maraden, P.: The measurement of plasma digoxin concentration: A comparison of two methods. *Europ. J. Clin. Pharmacol.* **5**: 22-27 (1972).
- 14) Smith, T. W. and Haber, E.: Clinical application of the determination of digitalis blood level. *Basic and Clinical pharmacology of digitalis*. C. C. Thomas. Publisher **281** (1972).
- 15) 吉田康彦：ネコにおける digitoxin およびその水溶性代謝物の腸管吸収。札幌医誌 **43**: 288-295 (1974).